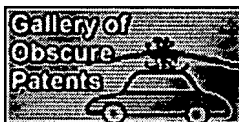


**DELPHION****Select****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION****Log Out** **Work Files** **Saved Searches**

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Der

**The Delphion Integrated View**Buy Now: ☒ PDF | [File History](#) | [Other choices](#)Tools: Add to Work File: [Create new Work](#)View: Jump to:  Go to: [Derwent](#) [Ema](#)Title: **JP01138461A2: METHOD FOR MANUFACTURING BIOLOGICAL ACTIVE COMPLEX**Derwent Title: Biologically active complex with enhanced resistance to inactivation - formed from molecule having biological activity and antibody recognising molecule  
[Derwent Record]Country: **JP Japan**Kind: **A**Inventor: **SHAMI EZEKIEL Y;  
ROTHSTEIN ASER;  
RAMJEESINGH MOHABIR;**Assignee: **HYBRISENS LTD**  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)Published / Filed: **1989-05-31 / 1988-07-07**Application Number: **JP1988000167854**IPC Code: Advanced: **A61K 39/395; A61K 47/48; C07K 14/00; C07K 16/00;  
C07K 19/00; C12N 9/82; C12N 9/96; G01N 33/531; G01N 33/532;**  
Core: **C12N 9/78**; more...  
IPC-7: **A61K 39/395; C07K 3/08; C07K 15/12; C12N 9/96; G01N 33/531;  
G01N 33/532;**Priority Number: **1988-06-21 US1988000205748**Abstract: **PURPOSE:** To adjust and extend activity by measuring the extension of a biological activity for the inactivity of a molecule according to conditions when including a molecule that is biologically active and an antibody entity for recognizing the molecule, preparing a complex that is biologically active, and exposing the complex to inactivating conditions.  
**CONSTITUTION:** A molecule that is biologically active and an antibody entity for recognizing the molecule are included and a complex that is biologically active is prepared, where the biologically active entity is for example enzyme, hormone, growth factor, and antibody and also can be a chemical species for generating such chemical change as an agent and a medicine. Then, when the complex is subjected to conditions for making inactive the molecule, the activity can be adjusted by measuring the extension of the biological activity for the inactivity of the molecule due to the conditions.**COPYRIGHT: (C)1989,JPO**INPADOC Legal Status: **None** Buy Now: [Family Legal Status Report](#)Family: [Show 13 known family members](#)Other Abstract Info: **None**



[Nominate this for the Gallery...](#)

Copyright © 1997-2007 The Tho

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact U](#)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-138461

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

G 01 N 33/531  
A 61 K 39/395  
C 07 K 3/08

識別記号

庁内整理番号

A-7906-2G  
A-7252-4C

⑭ 公開 平成1年(1989)5月31日

※  
審査請求 未請求 請求項の数 14 (全15頁)

⑮ 発明の名称 生物学的活性複合体の製造方法

⑯ 特 願 昭63-167854

⑰ 出 願 昭63(1988)7月7日

優先権主張 ⑱ 1987年7月7日 ⑲ 米国(US) ⑳ 071,861

㉑ 発 明 者 エゼキール・ワイ・シ カナダ国、オンタリオ、トロント、アパートメント  
ヤミ 321, リドル・アベニュー 377

㉒ 発 明 者 アサー・ロスステイン カナダ国、オンタリオ、トロント、アパートメント  
2019, ハーバー・スクエア 33

㉓ 出 願 人 ハイブライセンス・リ カナダ国、エム 3 ジエイ・1 ビー3、オンタリオ、トロ  
ミテッド ント、スイート 104、フアークハーソン・ビルデイン  
グ、ヨーク・ユニバーシティー・キャンパス、キール・ス  
トリート 4700

㉔ 代 理 人 弁理士 鈴江 武彦 外2名  
最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

生物学的活性複合体の製造方法

2 特許請求の範囲

1 (A) 生物学的活性である分子及び該分子を認識する抗体エンティティを包含し、生物学的活性である複合体を準備する工程、及び

(B) 該複合体を該分子を不活性にする条件に付した場合に、該条件による該分子の不活性に対して、生物学的活性の延長を測定する工程を包含する、不活性に対する向上した抵抗性を特徴とする生物学的活性複合体の製造方法。

2 工程(A)が分子-抗体複合体を形成するように該分子を認識するポリクローナル抗体に該分子をさらすことを包含する請求項1に記載の方法。

3 工程(A)が分子-抗体複合体を形成するように該分子を認識するモノクローナル抗体に該分子をさらすことを包含する請求項1に記載の方法。

4 該抗体エンティティが抗体フラグメント又は抗原結合蛋白質である請求項1に記載の方法。

5 該分子が酵素である請求項1に記載の方法。

6 該条件が、分裂温度、蛋白質分解酵素の存在下、分裂 pH、酸化剤の存在下、及びアルコールの存在下からなる群から選ばれる請求項1に記載の方法。

7 (I) 生物学的活性を有する分子及び (II) 該分子を認識する抗体エンティティを包含し、該複合体が該分子のものに対して不活性-抵抗である生物学活性を示す複合体。

8 該複合体が、

(A) 該分子と該抗体とを分子-抗体複合体が形成されるように反応させる工程、及び

(B) 該複合体を該分子を不活性にする条件に付した場合、該分子に対して、該複合体による該生物学的活性の延長を測定する工程、を包含する方法の生産物である請求項4に記載の複合体。

9 工程(A)が分子-抗体複合体を形成する

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-138461

⑤ Int.Cl.

G 01 N 33/531  
A 61 K 39/395  
C 07 K 3/08

識別記号

庁内整理番号

A-7906-2G  
A-7252-4C

⑬ 公開 平成1年(1989)5月31日

※  
審査請求 未請求 請求項の数 14 (全15頁)

⑭ 発明の名称 生物学的活性複合体の製造方法

⑰ 特 願 昭63-167854

⑱ 出 願 昭63(1988)7月7日

優先権主張 ⑲ 1987年7月7日 ⑳ 米国(US) ㉑ 071,861

⑳ 発 明 者 エゼキール・ワイ・シ カナダ国、オンタリオ、トロント、アパートメント  
ヤミ 321, リドル・アベニュー 377㉒ 発 明 者 アサー・ロスステイン カナダ国、オンタリオ、トロント、アパートメント  
2019, ハーバー・スクエア 33㉓ 出 願 人 ハイブライセンス・リ カナダ国、エム 3 ジエイ・1 ビー3、オンタリオ、トロ  
ミテッド ント、スイート 104、フアークハーソン・ビルディン  
グ、ヨーク・ユニバーシティー・キャンパス、キール・ス  
トリート 4700㉔ 代 理 人 弁理士 鈴江 武彦 外2名  
最終頁に続く

## 明 細 書

## 1 発明の名称

生物学的活性複合体の製造方法

## 2 特許請求の範囲

1 (A) 生物学的活性である分子及び該分子を認識する抗体エンティティを包含し、生物学的活性である複合体を準備する工程、及び

(B) 該複合体を該分子を不活性にする条件に付した場合に、該条件による該分子の不活性に対して、生物学的活性の延長を測定する工程を包含する、不活性に対する向上した抵抗性を特徴とする生物学的活性複合体の製造方法。

2 工程(A)が分子-抗体複合体を形成するように該分子を認識するポリクローナル抗体に該分子をさらすことを包含する請求項1に記載の方法。

3 工程(A)が分子-抗体複合体を形成するように該分子を認識するモノクローナル抗体に該分子をさらすことを包含する請求項1に記載の方法。

4 該抗体エンティティが抗体フラグメント又は抗原結合蛋白質である請求項1に記載の方法。

5 該分子が酵素である請求項1に記載の方法。

6 該条件が、分裂温度、蛋白質分解酵素の存在下、分裂 pH、酸化剤の存在下、及びアルコールの存在下からなる群から選ばれる請求項1に記載の方法。

7 (1) 生物学的活性を有する分子及び(11) 該分子を認識する抗体エンティティを包含し、該複合体が該分子のものに対して不活性-抵抗である生物学活性を示す複合体。

8 該複合体が、

(A) 該分子と該抗体とを分子-抗体複合体が形成されるように反応させる工程、及び

(B) 該複合体を該分子を不活性にする条件に付した場合、該分子に対して、該複合体による該生物学的活性の延長を測定する工程、を包含する方法の生産物である請求項4に記載の複合体。

9 工程(A)が分子-抗体複合体を形成する

ように該分子を認識するポリクローナル抗体に該分子をさらすことを包含する請求項8に記載の複合体。

10 工程(A)が分子-抗体複合体を形成するように該分子を認識するモノクローナル抗体に該分子をさらすことを包含する請求項8に記載の複合体。

11 該抗体エンティティが抗体フラグメント又は抗原結合蛋白質である請求項7に記載の複合体。

12 該分子が酵素である請求項7に記載の方法。

13 生物学的活性である分子及び該分子を認識する抗体エンティティを包含し、標識剤に対する少なくとも1の結合位置を示す複合体を準備する工程、及び

該複合体を該標識剤が該結合位置に結合するように該標識剤にさらす工程、及び次いで

該標識剤を有する該分子を放出するように該複合体の解離を行なう工程

を包含する、生物学的活性分子の標識方法。

14 該分子が抗体である請求項13に記載の方法。

[Chemical & Eng'g News, September 30, 1985, page 19 et seq] には蛋白質分解及び熱不活性化に抵抗性のアルブミン/酵素複合体

[complexes] の記述がある。一方、米国特許第4,179,337号は不活性抵抗性であるポリエチレングリコール/酵素複合体に関する。

生物学的活性エンティティは、様々な環境、例えば免疫検出及び診断法において標識形態で用いられる。標識は典型的には放射性同位体標識、酵素標識、蛍光標識、又は光度計で測定できる標識であり得る。標識の選択における一つの制限は生物学的活性エンティティの所望の生物学的活性の位置[site]に反応せず、潜在的に不活性であることである。

生物学的活性エンティティが不活性化条件に置かれる特定の場合における活性の劣化を遅らせるため各種の解決策が提案された。然しながら、各種の不活性化法に1の型の剤で対抗する一般的方法は従来形成されていない。

### 3 発明の詳細な説明

#### [産業上の利用分野]

本発明は、イン ビボ及びイン ビトロ不活性化に対して生物学的活性エンティティを保護するための抗体/抗原相互作用の利用に関する。

#### [従来の技術]

生物学的活性エンティティ[entities]、例えば酵素、ホルモン、成長因子、抗体及び薬剤は、その有用な寿命が不活性化で短縮される各種の医薬及び工業用途に用いられている。このような不活性化は、物理、化学又は生物学的な方法又は条件、又はある酵素の場合には、特定の分野の所望の活性の過程で同時に生じる自己分解によって生じ得る。不活性化はこのような不活性化過程の結合から生じ得る。ある場合には不活性化は迅速に生じ、活性エンティティの頻繁な置換を必要とする。

モザエフ等[V. V. Mozaev et al., Enzyme Microb. Technol., 1984, vol. 8, page 50 et seq] は、蛋白質における構造安定関係及び蛋白質を安定化する既存の方法を概観した。文献

#### [発明の概要]

本発明の目的は、抗体と生物学的活性抗原との間の相互反応を用いて、その活性の調節、及び特に延長を図ることにある。

更に、本発明の目的は所望の生物学的活性の不活性化に対して安定化された生物学的活性エンティティを提供することである。

また、本発明の他の目的は活性を維持するために生物学的活性エンティティの遅い放出の機構を提供することである。

上記目的を達成するため、本発明の一面では、(A)生物学的に活性である分子及び該分子を認識する抗体エンティティを包含し、該複合体が生物学的活性である複合体を準備する工程、及び(B)非複合分子を不活性化する条件に該複合体を置いた場合に、当該条件による分子の不活性化に対して生物学的活性の延長を測定する工程を包含する、不活性化に対する高められた抵抗を特徴とする生物学的活性複合体を製造する方法を提供するものである。好ましい態様において、工程

(A) は生物学的活性分子を該分子を認識するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体にさらすことを包含する。他の好ましい態様においては、抗体エンティティは抗体フラグメント又は抗原結合蛋白質である。

本発明の他の面では、(1)生物学的活性を有する分子及び(11)該分子を認識する抗体エンティティを包含する複合体を準備し、該複合体は遊離分子のものに比較して不活性化抵抗である生物学的活性を示す。好ましい態様では、該分子は酵素である。

本発明の他の面では方法も提供される。この方法は、(1)生物学的活性である分子及び該分子を認識する抗体エンティティを包含し、該複合体が標識剤に対して少なくとも1の結合位置を示す複合体を準備する工程、及び(2)該複合体を標識剤にさらして該標識剤を結合位置に結合させる工程、及び次いで(3)該複合体の解離

[disassociation]を行なって該標識剤を有する分子を放出する工程を包含する。好ましい態様で

はなく保護の目的での抗体/抗原相互作用の革新的利用は、以下に述べるように、抗体/抗原相互作用の従来認識されていた利用とは掛離れたものである。

本発明により生物学的活性の延長を達成するため、結合エンティティ〔後に説明する〕を調製する。これは分子〔“生物学的活性エンティティ”〕の少なくとも1の位置を認識し、該位置は活性に必要であり、かつ通常は分裂〔disrupting〕温度又はpH又は蛋白質分解酵素、アルコール又は酸化剤のような剤の存在下のような一定の条件下で不活性化に付される。この関係で適当な結合エンティティは、標準実験室動物の免疫系に生物学的活性エンティティの全て又は部分で挑戦して高められた抗体であり得る。あるいは、結合エンティティは、後述するように、生物学的活性エンティティを認識する抗原結合蛋白質であり得る。いずれにしても、所要の特異性を有するもの、即ち甚だしく生物学的活性をよわめることなく不活性化抑制的に生物学的活性エンティティを結合するも

は、該生物学的活性分子はそれ自体抗体である。

本発明の他の目的、特徴及び効果は以下の説明から明らかとなるであろう。詳細な説明及び特定の例は、本発明の好ましい態様ではあるが、説明のためにのみ示すものであり、本発明の精神及び範囲内での各種の変更及び修正はこれらの説明から当業者に明らかとなることは理解されるべきである。

#### 〔好ましい態様の説明〕

広範囲の生物学的活性分子は不活性過程の有害効果から該分子の感受性位置を保護するため抗体/抗原相互作用〔interactions〕を行なうことによって不活性化抵抗性とすることができ、それによって生物学的活性の損失が極めて遅くなることが見出された。抗体とその抗原との相互作用は抗原の究極破壊の第1過程であると考えられていたので、本発明による抗体/抗原相互作用の抗原の生物学的活性を延長するための利用は従来考えられなかった独創的な方法である。一般的に言えば、生物学的活性エンティティの破壊のため

のを同定するため、本発明に従って、推定結合エンティティを選抜することは慣用的事項である。

#### (i) “生物学的活性エンティティ”

特に、本発明に適した生物学的活性エンティティは所望の生物学的反応を促進し又は積極的に関与し、及び所望の生物学的反応の原因となり、寄与し又は関与する少なくとも1の第1位置を有する任意の分子であり得る。一般に、適当な生物学的活性エンティティは所望の生物学的反応に本質的に非寄与的である少なくとも1の第2位置をさらに有する。

“本質的に非寄与的”とは、少なくとも1の第2位置が所望の生物学的反応の第1位置の実行に本質的でないことを意味する。特に、第2位置は所望の生物学的活性に対して生物学的活性エンティティの不活性化を生じる工程において役割を果たし得る。この不活性化は、物理、化学又は生物学的な方法から又は該方法の組合せから生じ得る。

本発明に用いる生物学的活性エンティティは、例えば、酵素、ホルモン、成長因子及び抗体であ

り、また薬剤及び医薬のような生物学的変化を生じる化学種であり得る。適当な生物学的活性エンティティには、酵素、例えば $\alpha$ -アミラーゼ及び $\beta$ -アミラーゼのようなアミラーゼ；グルコアミラーゼ、グルコース イソメラーゼ、インベルターゼ；トリプシン及びズブチリシンのようなプロテアーゼ；ペクチナーゼ、L-アスパラギナーゼ、 $\alpha$ -1,4-グルコシダーゼ、コレステリル エステラーゼ、ウリカーゼ、カタラーゼ、スーパー オキシド ジスムターゼ、及びグルコース-6-フォスファターゼがある。他の生物学的活性エンティティはインターフェロン、組織プラスミノゲン アクチベータ及びそのムテイン、CEA〔癌胎児性抗原〕、HTLVに対する抗体及びマウス IgGに対する抗体のような抗体がある。

酵素、ホルモン等には、典型的には複数の第1位置及び一般に複数の第2位置がある。特定の適用に応じて、第1又は第2位置が抗体/抗原相互作用に寄与するが両者ではない。結合エンティティ〔後述する〕は抗体エンティティであり、この

ような位置は抗体エンティティが結合するエピトープである。薬剤及び医薬の場合には、第1位置は所望の生物学的活性の原因となる化学的配位又はリガンドであり得、また第2位置は同様に化学的配位又はリガンドであり得る。

好ましくは、第1及び第2位置は、結合エンティティとの結合後第2位置による第1位置の立体的又は他の干渉がないように離れて配置される。

(iii) “結合〔binding〕エンティティ”

結合エンティティは、特に、生物学的活性エンティティの特異部分又は位置を「認識する」〔結合する〕抗体エンティティである。本発明に適した抗体エンティティはポリクローナル抗体、1以上のモノクローナル抗体又は抗体の各種領域を含むアミノ酸配列であり得る。抗体エンティティは抗体の重及び軽鎖からそれぞれ誘導される超可変領域をも包含し得る。この鎖は次のものと連結〔link〕することができる。

— その天然〔イン ビボ〕配位、例えば Fab フラグメント、

— イン ビトロ交叉結合を行なうため、二官能性リンカーを用いて、化学修飾を介して、又は可変長ペプチド鎖を包含する連結エンティティを介して、これにより単一鎖抗体又は例えば米国特許第 4,704,692号に開示されたようないわゆる「抗原結合蛋白質」を提供する。

本発明の更に他の態様では、生物学的活性エンティティと抗体エンティティとの両者のDNAコード化は微生物又は動物細胞に組込むことができ、DNA遺伝子組換え技術を介して両エンティティの同時合成を行ない、2者の複合体を生じる。あるいは、生物学的活性分子と最初に選択した抗体エンティティとを、直接又は連結エンティティを介して、連結する新規で、共有結合的に組込まれたエンティティを合成する同様の方法を用いることができる。ここで2の選択したエンティティにおける相補位置が複合体を形成する。

本発明の抗体エンティティは、少なくとも1の第1位置が関係する所望の生物学的活性の劣化を生じる過程において第2位置による実質的又は遅

延関与を妨げるように生物学的活性エンティティの第2位置に結合することができる。抗体エンティティは免疫応答において形成され得る。そこで第2位置は抗原性又は抗体認識位置として作用する。これは本質的ではないが、抗体エンティティは第2位置のみを結合する必要がある。不活性化過程に関与しない。更に抗体エンティティは所望の生物学的活性の原因となる位置と、所望の生物学的活性が有用な目的を達成しない程度には、結合又は干渉しない。

生物学的活性分子と結合する、抗体のフラグメントと同様にポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を産生する方法は良く知られている。適当な方法には、ラビット又は他の標準実験室動物を生物学的活性エンティティで免疫することができる。これは所望の第1位置を「マスク」し、第1位置を認識する抑制抗体の発生を防ぐために予め修飾しておくことができる。例えば第1位置を結合する抗体を最初に産生することができる。次いで該抗体及び生物学的活性分子との複合体を非

抑制的ポリクローナル血清を上げるため抗原として用いる。通常の技術によって、次いで動物からとった抗血清を、その活性を破壊することなく、即ち、生物学的活性エンティティの第2位置を認識するが活性位置を認識しない抗体を産生するため、生物学的活性エンティティを結合する抗体源として用いることができる。

この技術を所望の第1位置を保護することなく用いる場合、例えばこのような位置を特定しなかった場合、それによって展開される異なるポリクローナル抗体試料の通常の試験を行なって生物学的活性エンティティを認識し、不活性化抵抗性である活性複合体を形成するものを特定することができる。

同様に、通常の体細胞-融合法、例えばケネット等の説明した方法 [Kennett et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81: 77-91, 1978] を本発明に用いるのに適したモノクローナル抗体を産生するのに用いることができる。例えば、マウスは生物学的活性エンティティ又はその部分で

既知の方法によって免疫化することができる。免疫マウスのヒ臓細胞を次いで取出し、コーラー及びミルスタインの方法 [Kohler 及び Milstein, 例えば Nature 256: 495-97, 1975 参照] に従って、ムリン ミエローマ ライン BALB/C NS-1 Ag 4-1 [ATCC No. TIB 18] のような不死化細胞系で融合し、生成融合産物を培養中で生存し所望の特異性のモノクローナル抗体を産生するものを選別する。こうして、各種ハイブリドーマを、不活性化条件下で [遊離分子に対して] 延長した活性を示す複合体を、生物学的活性エンティティで、形成するモノクローナル抗体の産生を試験することができる。

本発明によれば、生物学的活性エンティティは結合エンティティに結合する特異位置を特定するために分析できる。例えば活性位置を持たない生物学的活性エンティティのフラグメントを、その活性に干渉することなく生物学的活性エンティティを結合する抗体を産生するために抗原として用いることができる。

生物学的活性エンティティがそれ自体抗体である場合、その抗原結合位置は、本発明によって、通常抗体によって結合する抗原又は抗イデオタイプ抗体、即ち抗原結合位置を認識する抗体を用いて保護することができる。

#### (111) “不活性化”

本発明に用いる生物学的活性エンティティはエンティティの作業環境で起り得る物理、化学又は生物学的過程の結果として不活性化され得る。例えば、温度の分裂的上昇又は下降及び酸化は不活性化を起こし得る。生物学的活性エンティティが酵素である場合、不活性化は酵素自己破壊から生じ得る。

本発明における生物学的活性エンティティは該エンティティが従来用いられていた環境、及び従来活性が短命であるために實際上用いられなかった環境で用いることができる。例えば、酵素の薬剤又は治療剤としての使用は体内におけるバイオ分解又は不活性化のために制限される。本発明はこの問題を克服する手段を提供するものである。

同様に、本発明によって、用いられる抗体は、免疫遺伝学的又は診断方法において必要とされる抗体の活性位置に干渉することなく所望の薬剤、剤又は他の種として標識又は複合体化することができる。即ち、抗体はしばしば標識の目的で化学的に修飾される。これらの反応の多くはランダムで結合位置の化学的修飾のため抗体の一定割合を不活性にする。これは、本発明によれば、化学修飾 [標識] の前に抗体をその抗原 [好ましくは固体表面に固定化した抗原] と反応させて結合位置を占めかつ保護することによって防ぐことができる。その後、標識過程が完了したとき、例えば低 pH 緩衝液で抗体/抗原複合体を解離することができ、かつ標識抗体を回収し使用する。

逆に、抗原を標識する場合、その抗体を固定化することができ、抗原を添加し、標識 [及びその後の溶出] を行なって抗体を除く。

インタフェロン及びエリトロポイエチンのような成長因子は血清中で、主として酵素的分解のため極めて短い半減期を有する。この問題は、通常

のグリコシル化が起こらず、従って天然発生分子内に見出される炭水化物残基がないエンジニアード生物で薬剤が製造された場合に増大する。エリトロポイエチンの場合、これらの残基は酵素的破壊に対する保護を提供する。特異抗体は同様の保護を提供することができ、廉価な遺伝学的エンジニアードエリトロポイエチンの使用を可能にする。一定の細胞タイプの成長及び増殖に影響を及ぼすために用いられる表皮増殖因子[EGF]のような成長因子は、成長細胞が分泌する分解酵素で減少する有効性を有する。従って、その効能は、抗体エンティティとの結合により、本発明によって改良される。

動物成長ホルモンは飼育動物の体重又は乳生産を増大するために用いることができる。然し、蛋白質分解酵素及び他の酵素による注射ホルモンのインビトロの迅速不活性化は、面倒なホルモンの毎日の注射が必要であると考えられている。然しながら、本発明により、特異抗体とのホルモンの結合による成長ホルモンの保護はその能力を不

する。標識剤は結合しているので第1位置との反応には利用できない。本発明によって、生物学的活性種は結合エンティティと複合体化して種が時間をかけて遅く放出されることを確保する。こうして、そうでなければ毒性又は副作用のために受入れられない[複合化]種の単一高投与量が利用でき、従って、頻繁な投与[又は迅速分解種の高い投与量]を避けることができる。

#### [実施例]

本発明は次の実施例で更に説明する。

例1 抗体保護した又は保護しない $\alpha$ -アミラーゼに対する温度の影響

比較試験を $\alpha$ -アミラーゼ及び本発明によって安定化した $\alpha$ -アミラーゼについて詳細に後述するように行なった。

第1図において、プロットAは、本発明により安定化した $\alpha$ -アミラーゼは70℃において3時間後に100%活性、及び16時間後に50%活性を保持していたのに対し、本発明による活性化をしない $\alpha$ -アミラーゼ[プロットB]は同一温

度に減少することなく酵素分解からホルモンを保護することができる。その結果として、低い投与量及び少ない注射で有効ホルモン水準を維持できる。

他の酵素による不活性化に対する酵素の保護に加えて、本発明は自己分解から酵素を保護するため用いることができる。例えば、多くの洗浄剤に用いられるズブチリシンのような蛋白質分解酵素は本発明によって特異抗体エンティティによる自己分解から保護され得る。

本発明によれば、そうでなければ活性の所望の位置に影響を及ぼす副反応の結果として不適当となる標識エンティティの使用を可能にもする。即ち、所望の位置は結合エンティティと最初に結合して複合体を形成し、その後該複合体を通常の方法で標識剤で標識し、該標識エンティティは少なくとも1の第2位置で結合する。該標識エンティティが第2位置に結合した後、結合エンティティを通常の方法で標識複合体から除き第1位置が遊離している標識生物学的活性エンティティを準備

度で僅か15分後に完全に不活性化した[0%活性]ことを示している。同様に、熱不活性化に対する相対的抵抗性は、第2図のプロットC[安定化 $\alpha$ -アミラーゼ]とプロットD[遊離酵素]との比較から明らかである。

ヒト唾液 $\alpha$ -アミラーゼ[EC 3. 2. 1. 1; シグマ カタログNo. A 052]ストック溶液[100単位/ml、又は0.1%蛋白質/ml]を5mM CaCl<sub>2</sub>及び0.9% NaCl中につくった。酵素の「保護」形態を得るため、容量等量の35単位の $\alpha$ -アミラーゼ溶液を、シグマケミカル社から購入したラビットポリクローナル(IgG)抗ヒト唾液 $\alpha$ -アミラーゼ抗体[カタログNo. A 8273; 蛋白質含量: 2.85% / ml; 評価特異抗体含量0.1425% / ml]を含む245 $\mu$ lの5mM CaCl<sub>2</sub> / 0.9% NaCl溶液に加えた。この混合物を次いで4℃で一夜インキュベートした。

生成試験組成物の $\alpha$ -アミラーゼと特異IgGのモル比は名目的に2:1であり、340nmにお

ける増加吸収度の関数として酵素仲介マルトース産生をモニタする市販のキット〔No. 575-U V ; シグマ ケミカル社の製品, セントルイス, MO〕を用いて58.8単位/mlの酵素活性を測定した。同一活性の対照〔非保護〕組成物を、同一の基本的プロトコルに従い、 $\alpha$ -アミラーゼと正常マウスIgG、即ちヒト $\alpha$ -アミラーゼにさらされないマウスからのIgGとの混合によって製造した。

試験及び比較組成物のCaCl<sub>2</sub>/NaCl溶液による試料希釈〔100 $\mu$ l ; 2.94単位/ml〕を、それぞれ、特定の温度に予め温度調整したグリフォード「レスポンス」UV-VIS分光光度計においた、5分間インキュベーション後、各試料を取出し氷水で冷却した、分光光度計を30℃に再調整した後、試料を再導入し、それぞれ30℃に平衡化し340nmにおける吸収度の増加を介して測定して酵素活性を〔上記シグマ キットを用いて〕試験した。

保護及び非保護試料を次の温度においた：室温

した湯浴を用いた。保護及び非保護 $\alpha$ -アミラーゼ希釈の1.5mlアリコットを含む2のチューブを、それぞれ、湯浴で1, 2, 3, 4, 5, 6, 16, 18及び20時間インキュベートした。各時間の終わりに、100 $\mu$ lの各試料をキュベットにピペットで取出し氷水で冷却した。5分後、2試料を30℃に調整した分光光度計に置き、各試料の酵素活性を測定した。

各インキュベーション時間の線状速度定数を測定し、所定のインキュベーション時間について%活性を次のように計算した。

$$\frac{\text{時間 } T \text{ について } 70^{\circ}\text{C の速度}}{\text{RT における速度 [0 インキュベーション時間 } 70^{\circ}\text{C]}} \times 100$$

70℃におけるパーセント活性対インキュベーション時間のプロットは第1図に示す。

前記と実質的に同様の試験を酵素ズブチリシン及びグルコアミラーゼについて行なった。両生物学的活性分子について、本発明によるポリクロナル抗体の使用は、分裂的高温条件において、非

〔RT, 約22°〕, 65°, 68°, 70°, 72°, 75°, 80°, 85°及び90℃。各温度における線状速度定数を測定し、次のようにパーセント活性を計算した。

$$\frac{T^{\circ} \text{ における速度}}{RT \text{ における速度}} \times 100$$

こうして得られたパーセント活性対温度のプロットは第2図に示す。

別個の実験で、試験及び対照希釈を上記のように調製し、100 $\mu$ lの試料の非保護又は保護酵素をギルフォード分光光度計の5キュベットのそれぞれに加え、温度を70℃に調節した。0, 5, 10, 15及び30分後、それぞれ、1キュベットを取出し、直ちに氷水で冷却する。最終インキュベーションの後、分光光度計を30℃に再調整した。キュベットを再挿入し、5分間試料を平衡化した後、各試料を前述したように酵素活性について試験した。

長期インキュベーションのため、70℃に設定

保護酵素に対して活性の延長をもたらした。即ち、遊離のズブチリシンは65℃で5分以内に当初活性の50%を失ったが、ズブチリシン-抗体複合体は同一温度で少なくとも3時間その活性の50%以上を保持した。同様に、非保護グルコアミラーゼは僅か5分で〔半減期：約2分〕その活性の95%を失ったが、保護酵素は3時間後〔半減期：>3時間〕に50%を超える活性であった。

例2 抗体保護及び非保護アスパラギナーゼに対するトリプシンの影響

A ポリクロナル抗体の使用：マウスポリクロナル抗アスパラギナーゼ血清を蛋白質-Aカラム上で精製し水に対して17時間透析した。透析IgG分画を次いで真空透析で蛋白質濃度100 $\mu$ g/mlに濃縮した。生成濃縮物〔「抗体溶液」〕は推定特異A-IgG濃度5%であった。その後、0.1MボレートHCL/0.1mMEDTA緩衝液〔pH9.0〕に溶解した1.2単位のL-アスパラギナーゼ〔EC3.5.1.1〕を1.12mlの抗体溶液と混合し、酵素対特

異抗体の 1 : 1 モル比を得、混合物を 4℃ で一夜インキュベートした。水 [0.82 ml, pH 9.2] を次いで添加して最終濃度を 0.6 単位の保護アスパラギナーゼ/ml とした。

アスパラギナーゼの抗体-保護及び非保護試料 [0.15 単位/それぞれの ml] を 37℃ において 5 分間 pH 9.2 の水中で 5 単位/ml のトリプシン [シグマ カタログ No. T1005] でプレインキュベートした。トリプシン処理試料を次いで予め 37℃ に設定したギルフォード分光光度計の熱ホルダの 2 のキューベットに移した。等容量の基体 [水中 2 mM L-アスパラギン, pH 9.2] を次いで添加し、L-アスパラギン [1 mM 最終] の L-アスパラギン酸への変換を 37℃ で 197 nm において監視した。

結果は、次の表 1 に示すように、本発明により保護したアスパラギナーゼに比較してトリプシンの存在下で非保護アスパラギナーゼによる L-アスパラギンの変換速度は極めて低いことを示す。

の BALB-C マウスのそれぞれに腹腔内注射した。日 12 後注射に、第 1 追加免疫をフォスフェート緩衝液中 50 マイクログラムの酵素の形態で腹腔内注射して与えた。日 15 に、マウスを採血し、その抗体タイタを ELISA 法で測定した。最高タイタのものに同一成分の第 2 追加免疫を与え、3 日後に殺してヒ臓細胞を体細胞融合に用いるために除いた。

7 日後、成長ハイブリドーマからの上澄みを L-アスパラギナーゼに対する陽性反応を ELISA 法で試験した。最も有望なハイブリッドを「制限希釈法」[Lefkovits 及び Waldmann, Limiting dilution analysis of cells in the immune system, Cambridge Univ. Press 1979] によってクローンした。産生モノクローナル抗体の 6 クローンを得て、それぞれ No. 12, No. 19, No. 29, No. 33, No. 34 及び No. 35 と標識した。

酵素-抗体複合体の 5 試料を次のように調製した。25 µl [0.05 単位] の L-アスパラギ

表 1

実験	1mM L-アスパラギンの L-アスパラギン酸への 50% 変換時間	分当り % 変換
1 * A B 保護	20.5 分	2.5 %
* 非保護	* * 7.15 時間	0.116 %
2 * A B 保護	20.5 分	2.5 %
* 非保護	* * * 11.5 時間	0.07 %

\* 保護及び非保護アスパラギナーゼの両者をアスパラギナーゼ濃度 0.15 単位/ml で 5 単位/ml のトリプシンによって処理した。  
 \* \* 変換/分に基づき外挿法で得た。  
 \* \* \* 基体でのインキュベーション 20 時間後変換の終点測定に基づき内挿法で得た。

B 各種モノクローナル抗体の使用: L-アスパラギナーゼに対するモノクローナル抗体 [MAbs] をコーラー及びミルステインの方法に従って調製した。フォスフェート緩衝液及び完全フロインド助剤 [1 : 1 容量比] に懸濁した 50 マイクログラムの L-アスパラギナーゼを 4

ナーゼを含む試料に、それぞれ酵素単位当り 1, 2, 6, 10 及び 20 µg 蛋白質の割合を提供する量で抗体を加えた。水を加えて最終試料容量 500 µl とした。このようにして試料をモノクローナル抗体 No. 12, No. 29, No. 34 及び No. 35 及びウシ血清アルブミン [BSA] で調製し、後述する試験の前 4℃ で一夜貯蔵した。

それに加えて、1.5 当量 [3.5 µg] の各酵素-特異 MAbs を 0.5 単位 [2.33 µg] の L-アスパラギナーゼに加えた。同様に、酵素-抗体複合体の試料を 4 の MAbs [Nos. 12, 29, 34 及び 35] 及び 3 の MAbs [Nos. 12, 29 及び 34] をそれぞれ組合せて用いて調製した。

温度制御、6-位置、10 mm キューベットホルダを備えたギルフォード「応答」分光光度計を 37℃ に設定し、1 のモノクローナル抗体を用いて調製したそれぞれ 50 µl の 5 試料を別個のキューベットに加えた。水 [35 µl] 及びトリプシン [15 µl : 1.5 単位] を加え、溶液を 37

で 5 分間インキュベートした。この時間の終りにキュベットを取出し氷水で冷却した。分光光度計を 25℃ に再調整した後、キュベットを再挿入し 5 分間平衡化した。水 [100 μℓ; pH 9.0] 及び基体 [200 μℓ] を加え、バスツール ビベットで混合した。L-アスパラギンの L-アスパラギン酸への変換速度 [197 nmにおける吸収度減少/分] を各試料について測定した。

別個の実験で、4 のマルチ-MAb 試料のそれぞれの 65 μℓ [0.65 単位] を分光光度計の別個のキュベットに加えた。水 [15 μℓ]、トリプシン [20 μℓ, 2 単位] 及び基体 [200 μℓ] を加え、L-アスパラギンの L-アスパラギン酸への変換速度を各試料について測定した。25 μℓ の酵素を水で希釈して最終容量 650 μℓ として調製した対照試料をトリプシンの添加をし又はしないで行なった。4 の単一-MAb 試料のそれぞれ及び BSA-MAb 試料についての L-アスパラギナーゼ活性対抗体濃度 [L-アスパラギナーゼの単位当り加えた μg 蛋

白質) を水で 2 ml に希釈して調製した。

両試料を水で保存し希 HCl で pH 3 に調節した。それぞれの 50 μℓ アリコットをキュベットに加え、150 μℓ の水 [pH 9.2] を 200 μℓ の基体と共に加え、溶液を混合した。各試料の活性を、L-アスパラギンの L-アスパラギン酸への変換速度に関して、25℃ に設定したギルフォード「応答」分光光度計で測定した [0 時間, T<sub>0</sub>]。

次いで 2 の試料を 37℃ に設定した湯浴に置いた。それぞれのアリコット [50 μℓ] を 5, 15, 45 及び 65 分の間隔で、及び 3 及び 18 時間後にとった。これらの試料のそれぞれの活性を上記のように測定した。所定のインキュベーション時間 [T<sub>x</sub>] についてのパーセント活性を次のように計算した。

$$\frac{T_x \text{ における変換速度}}{T_0 \text{ における変換速度}} \times 100$$

L-アスパラギナーゼ残留活性に対する pH 3 におけるインキュベーション時間のプロットは第 5

白質] のプロットは第 3 図に示す。1 mM の L-アスパラギンの L-アスパラギン酸へのパーセント変換対時間はマルチ-MAb 試料について第 4 図にプロットしてある。これらの結果は、(1) 保護の程度は MAb から MAb で変わり、No. 12 が最も有効であり、かつ (2) 無関係蛋白質 [BSA] は実質的に保護を生じないことを示す。保護の重要な水準は MAb No. 12 単独 - 非保護トリプシンチャレンジ酵素は同一条件下でその活性の 90% 以上を失う - で達成されるが、保護は 4 又は 5 モノクローナル抗体の使用を必要とする非チャレンジ対照のものとはほぼ等しい。

例 3 分裂 pH の影響に対する L-アスパラギナーゼの保護

例 [Nos. 12, 29, 34 及び 35] からの 4 の MAb s のそれぞれの 3 当量 [10, 26 μg] を 45 μℓ の L-アスパラギナーゼ [0.9 単位, 3.214 μg] に加えて最終容量 2.1 ml とした。試料を 4℃ で一夜インキュベートした。対照試料を、100 μℓ の L-アスパ

ラギナーゼを水で 2 ml に希釈して調製した。図に示す。4 の MAb s の混合物で保護した酵素は 2 時間後その活性の 30% 以上を保持したが、非保護酵素は僅か 45 分後にその活性の 2% 未満であった。

例 4 自己消化に対するトリプシンの保護

ラビット ポリクローナル抗トリプシン血清をベントレックス [Ventrex Laboratories, Portland, ME] から得た。IgG 分画を MAPS II 蛋白質 A キット [Bio-Rad Laboratories の製品, Richmond, CA] を用いて血清から精製した。精製 IgG 分画を緩衝液を数回変えて 0.1 M トリス-HCl [pH 8.0] に対して透析した。生成抗体溶液の最終蛋白質濃度は 800 μg/ml で、トリプシン特異 IgG の推定含量は 5%、特異抗体の濃度は 40 μg/ml であった。

同一トリス-HCl 緩衝液中トリプシン溶液の 20 μℓ [20 単位; 2 μg] を 315 μℓ [12.6 μg の特異 IgG; 252 μg の全 IgG] の抗体溶液に加え、トリプシン対特異

1 g G を 1 : 1 モル比とした。水 [65  $\mu$ l] を加えて最終トリプシン濃度を 50 単位 / ml とした。

2 の対照を調製した。1 は 252  $\mu$ g のウシ血清アルブミンを含み、他は蛋白質を含まない。最終トリプシン濃度は 50 単位 / ml であった。

全ての試料を 4℃ でインキュベートし、それぞれの 50  $\mu$ l を、上記ギルフォード分光光度計 [温度: 25℃; 吸収 247 nm] によって 0, 1, 3, 5 及び 6 日にトリプシン活性を評価した。各試料の線状速度定数を次いで測定し例 3 に説明したように残留活性を計算した。

ラビット抗トリプシン ポリクローナル抗体で保護したトリプシンは 3 日までその活性を 100% 保持したが、非保護トリプシンは 4℃ で 1 日後にその活性の 75% を失った。第 6 図に示すように、パーセント活性を時間 [日] に対してプロットすると、非特異蛋白質 [BSA] をトリプシンに加えた場合、3 日後にその活性の 50% 保護があったが、この保護は抗体に関連するものより極めて低かった。更に、BSA による保護は 5 日後

を次いでそれぞれの試料に加え、37℃ で、基体の加水分解速度に関連した 410 nm の吸収の増加を観察して酵素の活性を測定した。

酸化剤濃度範囲 0.04% ~ 0.15% において、保護酵素は非保護酵素より少なくとも 2 倍活性であった。同様にして、保護ズブチリシンは、種々の時間 0.05% の次亜塩素酸ナトリウムにさらしたとき、同一条件にさらした非保護酵素よりその活性を長く保持した [第 7 図参照]。

0.05% 次亜塩素酸ナトリウムとの 30 分間ブレインキュベーションの後、例えば、保護ズブチリシンは当初活性の 75% を超えて保持したが、非保護ズブチリシンは当初活性の 25% 未満を示した。

例 6 アルコールの影響に対するグルコアミラーゼの保護

ラビット抗グルコアミラーゼ ポリクローナル抗体で保護したグルコアミラーゼ [DIAZYME L-200; Miles Laboratories の製品] を例 5 に従って調製した。酵素-抗体複合体及

にはほぼゼロに下がるが、抗体を用いた場合には 6 日後に 30% 保護が保持される。

例 5 酸化剤による不活性化に対するズブチリシンの保護

ズブチリシン-抗体複合体を例 3 のように調製した。非保護対照を、1.25  $\mu$ g のズブチリシン [EC 3.4.21.14; Boehringer Mannheim Catalog No. 165905] を 1.5 ml の 50 mM KCl 及び 50 mM トリス-HCl 緩衝液中 136  $\mu$ g の BSA に加えて調製した。0.5 mM 溶液の酵素基体、N-スクシニル-L-ala-L-ala-pro-phe p-ニトロアニリド、を 0.1 M トリス-HCl 緩衝液 [pH 7.8] 中で調製した。6% の次亜塩素酸ナトリウムを含む市販の漂白剤 [JAVEX] を酸化剤として用いた。

マウス抗ズブチリシン ポリクローナル抗体で保護したズブチリシンの試料及び非保護ズブチリシンの試料を、それぞれ、37℃ で 15 分間増加する濃度の次亜塩素酸ナトリウムに付した。基体

び非保護グルコアミラーゼ プラス非免疫ヒト 1 g G のそれぞれの 3 試料のセットをアルコールなし、2.5% エタノール、及び 5% エタノール [v/v] にさらした。試料は酵素活性を評価する前に 37℃ で種々の時間インキュベートした。

結果は第 8 図に示す。2.5% 及び 5% エタノールにさらした非保護試料はそれぞれ 8 及び 10 時間で活性の 50% を失った。保護試料は、対照的に 10 時間後に当初活性の 5% 未満の平均損失を被った。

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は  $\alpha$ -アミラーゼの 70℃ における時間に伴う活性の損失を本発明によって安定化した同一酵素と比較して示すグラフである。

第 2 図は第 1 図の生物学的活性エンティティの活性の温度の増加に伴う損失を本発明によって安定化した同一エンティティと比較して示すグラフである。

第 3 図は本発明によって生物学的活性を保護するために用いた各種抗体エンティティ又は他の蛋

白質の濃度の増加の関数として生物学的活性エンティティ、アスパラギナーゼ、の〔トリプシンの存在下〕残留活性をプロットしたグラフである。

第4図は本発明によってモノクローナル抗体の各種組合せで酵素を保護した場合の時間に伴うトリプシンの存在下のアスパラギナーゼの残留活性を示すグラフである。

第5図は生物学的活性エンティティを37℃でpH3.0に付した場合の同一条件下で本発明によって保護した酵素によって示される活性の延長と比較してアスパラギナーゼの活性の損失を示すグラフである。

第6図は本発明によって保護したトリプシンと比較して生物学的活性エンティティ〔トリプシン〕の時間に伴う自己分解による活性の損失を示すグラフである。

第7図は0.05% NaOClの存在下で他の生物学的活性エンティティ、ズブチリシン、の活性の損失を本発明によって保護した同一エンティティと比較して示すグラフである。

第8図は生物学的活性エンティティをアルコール濃度の増加にさらしたときのグルコアミラーゼの活性の損失を本発明によって保護した同一エンティティと比較して示すグラフである。

出願人代理人 弁理士 鈴江武彦

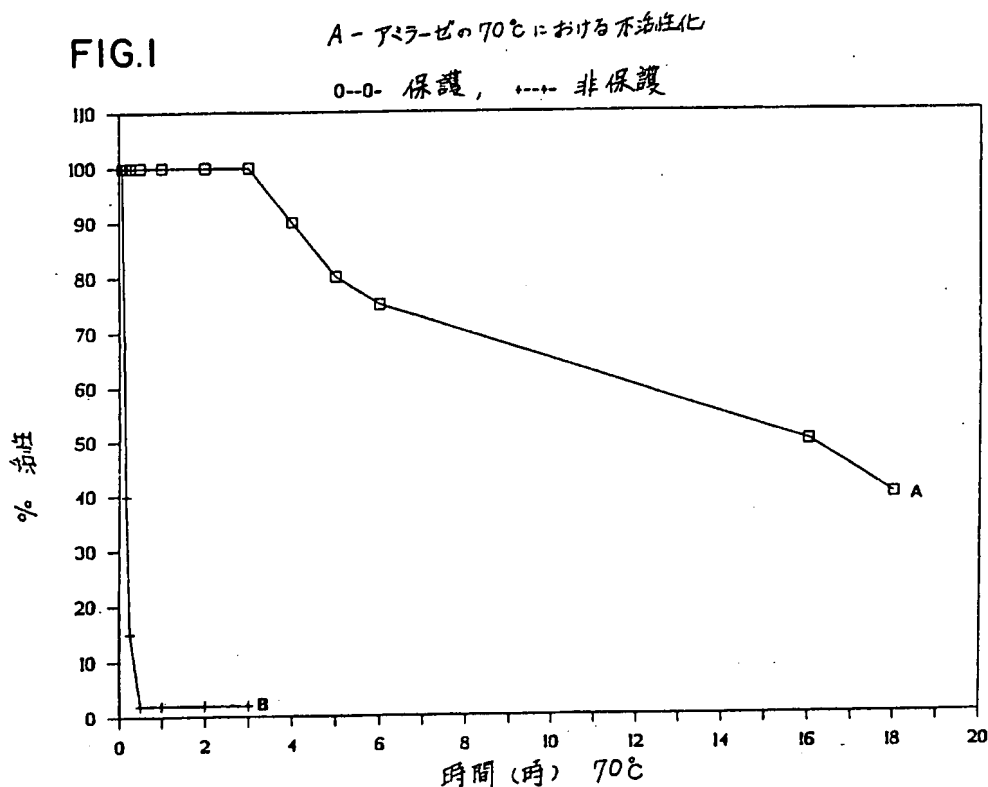


FIG.2

A - アミラーゼの熱不活性化

○-○- 保護, ---- 非保護

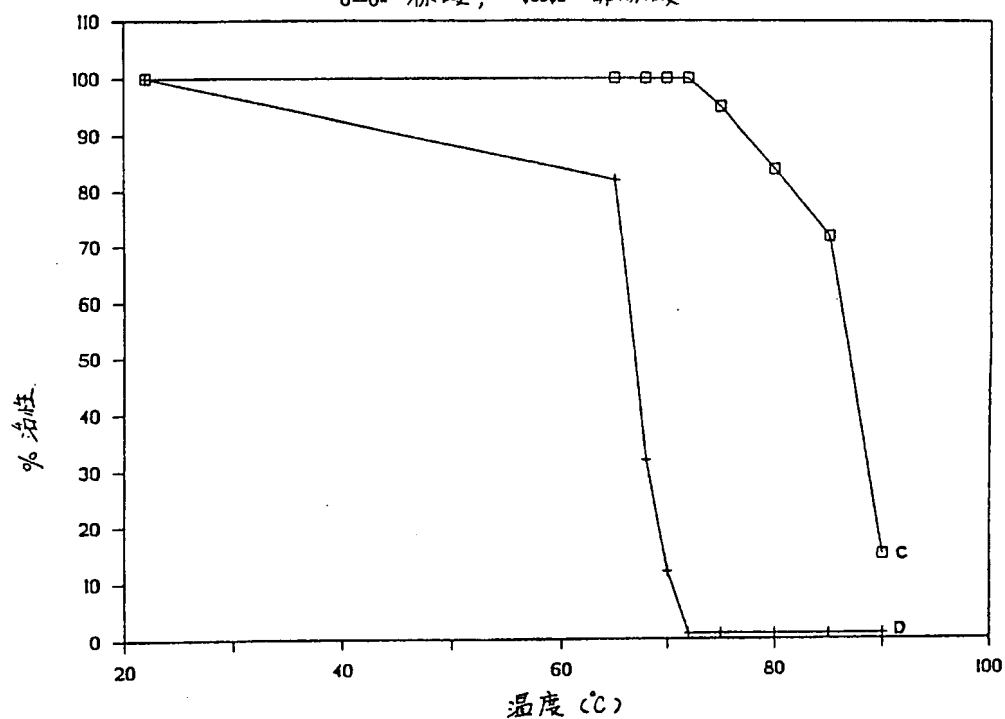


FIG.3

単-MABの保護効果

トリプシンでプレインキュベートしたアスパラギナーゼ

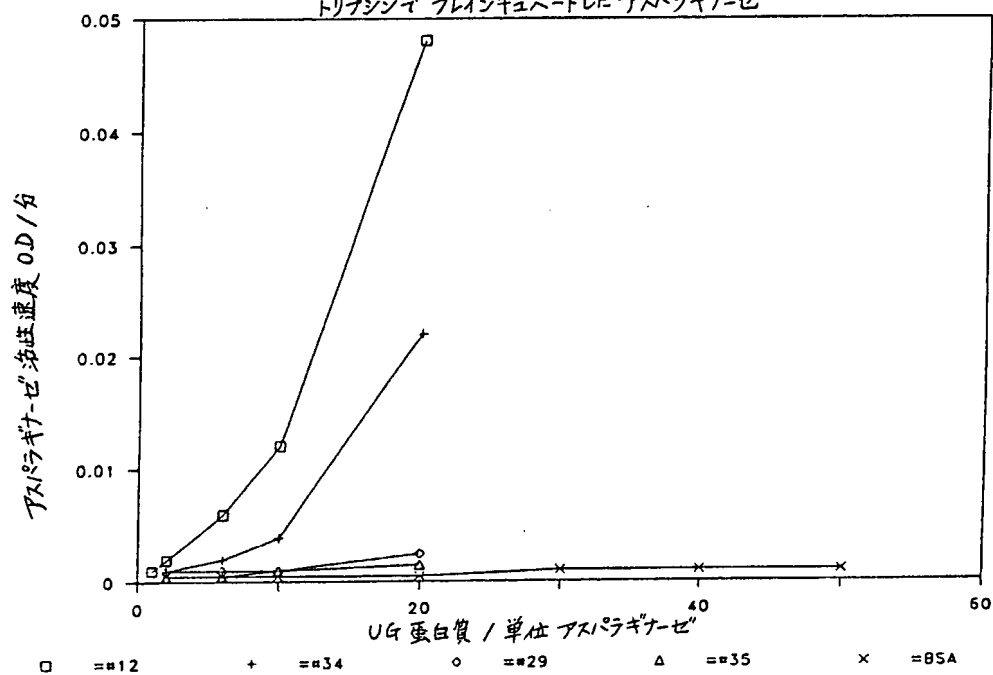


FIG. 4

L-アスパラギナーゼに対する MAB 保護効果  
T=0 でトリプシン + 基体を加えた

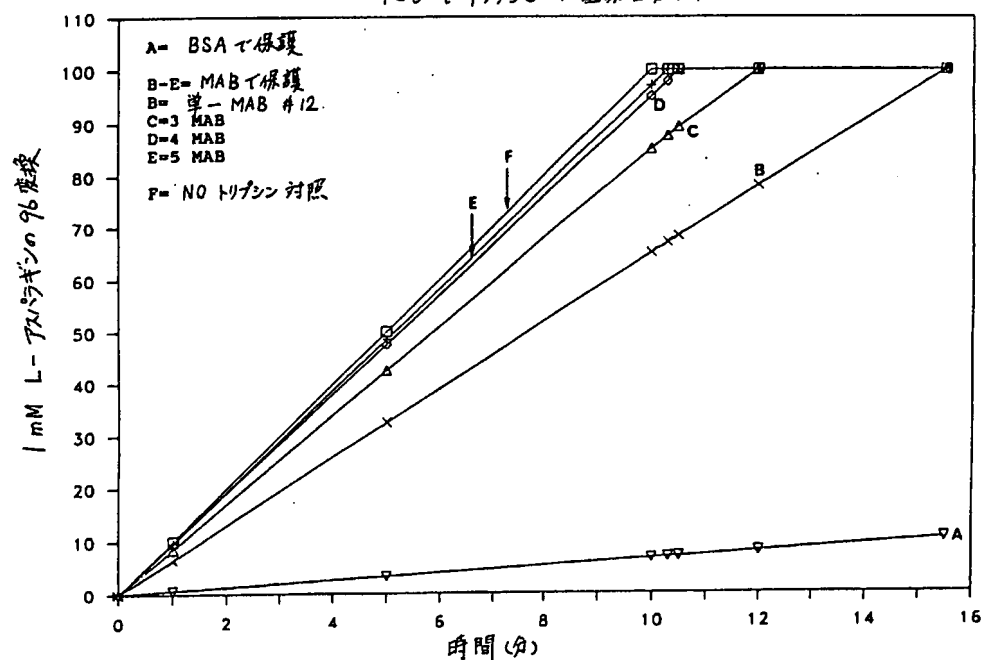


FIG. 5

L-アスパラギナーゼ活性に対する pH の影響  
試料は 37°C, pH 3.0 でプレインキュベートした

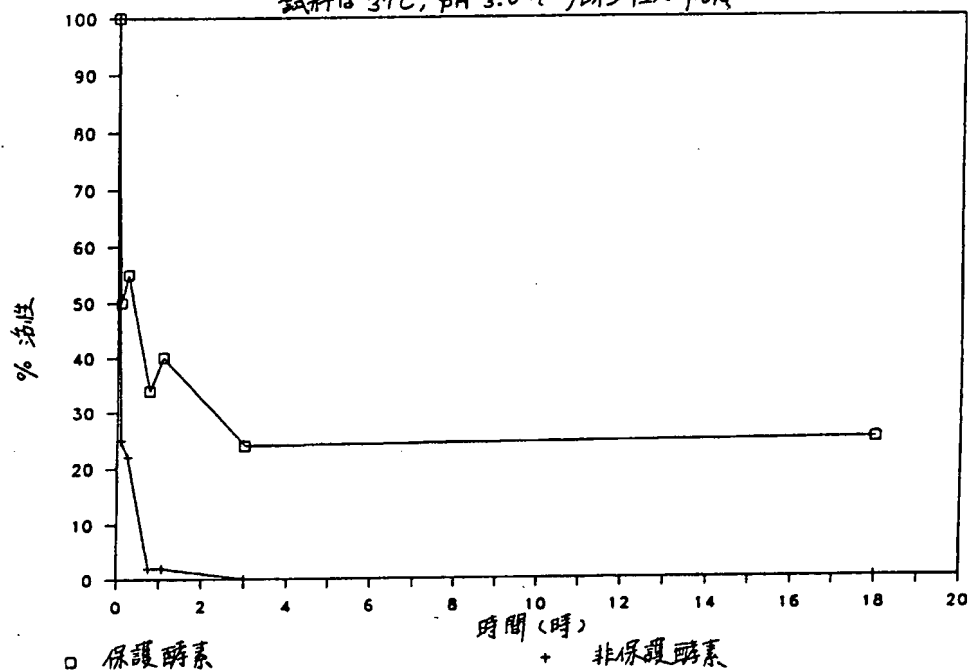


FIG.6

トリプシン 自己消化

4°C

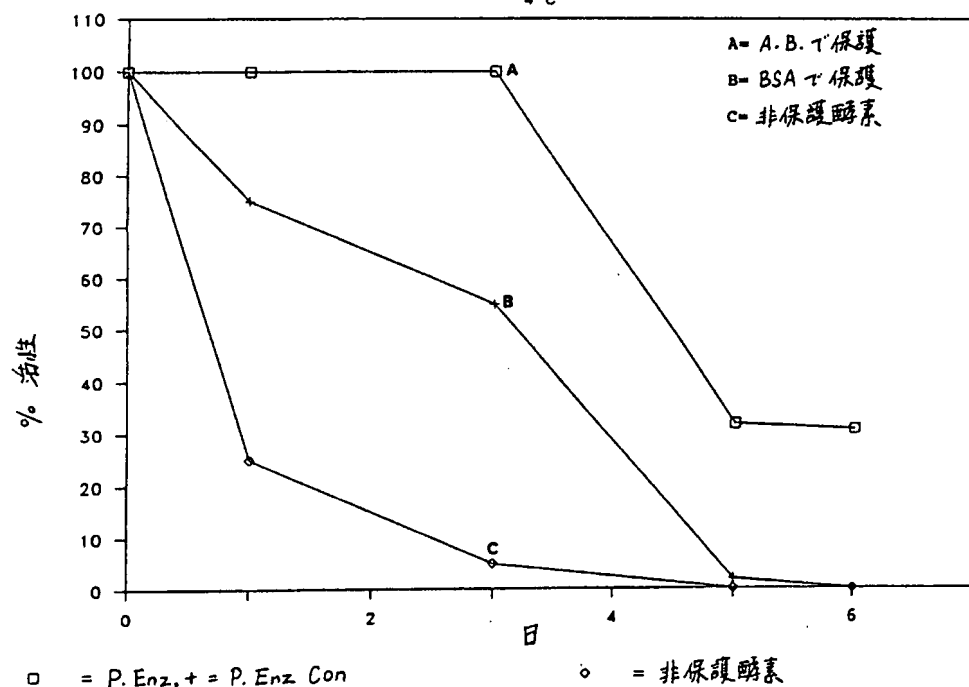


FIG.7

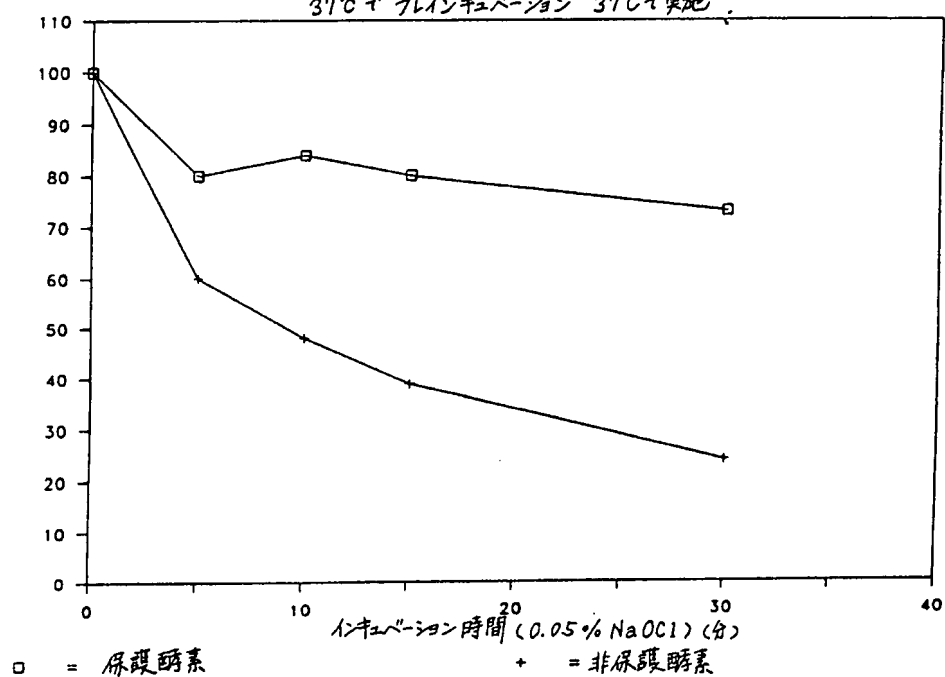
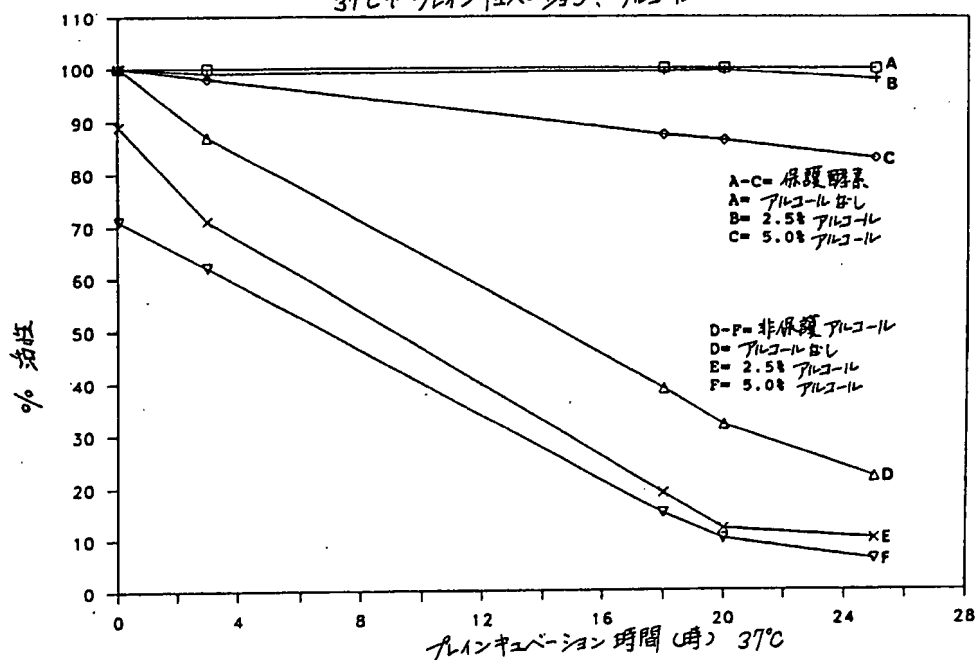
 デグナリシンに対する NaOCl (0.05%) の影響  
 37°C で プレインキュベーション 37°C で実施


FIG.8

グルコサミターゼに対するアルコールの影響  
37°Cでプレインキュベーション、アルコール



第1頁の続き

⑤ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

C 07 K 15/12

8318-4H

C 12 N 9/96

8717-4B

G 01 N 33/532

A-7906-2G

優先権主張

②1988年4月18日 ③米国(U S) ④182,530

②1988年6月21日 ③米国(U S) ④205748

⑦発明者

モハビア・ラムジエー

カナダ国、オンタリオ、ミシソウガ、チャリス・クレセン

シン

ト 1508